

Tumorassoziiertes Antigen (B345)

The present application claims the benefit, under 35  
5 U.S.C. § 119, of the earlier filing dates of German  
Patent Application No. DE 100 33 080.0, filed July 7,  
2000; German Patent Application No. DE 101 19 294.0,  
filed April 19, 2001; U.S. Provisional Application No.  
60/243,158, filed October 25, 2000; and U.S. Provisional  
10 Application No. 60/297,747, filed June 14, 2001. The  
contents of each of these applications are entirely  
incorporated herein by reference.

Die Erfindung bezieht sich auf die Chemotherapie von  
15 Tumorerkrankungen.

Normale Körperzellen unterliegen einem strikt geordneten  
System, das das Wachstum, die Zellteilung und das  
Absterben bestimmter Zellen kontrolliert. So teilen sich  
Körperzellen einer erwachsenen Person nur dann, wenn sie  
20 tote Zellen ersetzen oder eine Verletzung verheilen  
müssen. Krebszellen dagegen wachsen unkontrolliert  
weiter, sie akkumulieren und bilden einen Tumor.  
Erreicht der Tumor eine kritische Größe, können  
Krebszellen über die Blutbahnen oder das Lymphsystem  
25 auch in andere Bereiche des Körpers transportiert werden  
und dort Kolonien bilden (Metastasen). Nicht alle Tumore  
sind kanzerogen, denn benigne Tumore metastasieren nicht  
und sind daher meistens nicht lebensgefährlich, da sie

chirurgisch entfernt werden können. Detailliertere Informationen zu diesem Thema sowie den weiter unten diskutierten Aspekten der Tumorentstehung geben folgende Publikationen: Rauscher und Vogt, 1997; Kastan, 1997;

5 Hesketh, 1995; Puszta, Lewis und Yap, 1995.

Die Transformation einer gesunden Zelle in eine Krebszelle kann durch eine ganze Reihe von Faktoren, wie Umwelteinflüsse, Strahlung, Viren oder chemische Reagenzien ausgelöst werden. Bei der Tumorentwicklung

10 spielen jedoch auch epigenetische (Methylierungen, Acetylierungen und veränderte Chromatinstruktur) und genetische Modifikationen (Punktmutation, Deletion, Amplifikation, Translokation) eine bedeutendende Rolle.

Mutationen in kodierenden Bereichen von Genen, die an 15 der Regulation der Zell-Proliferation beteiligt sind, können an der Überführung einer normalen Zelle in eine Tumorzelle beitragen, da die transformierte Zelle Wachstumsvorteile gegenüber ihrer gesunden Nachbarzelle hat.

20 Krebs entsteht also durch eine Ansammlung von vererbten oder erworbenen Mutationen in kritischen Protoonkogenen oder Tumorsuppressorgenen.

Die Zellproliferation steht unter der Kontrolle verschiedener Gensysteme, während Produkte von Onkogenen 25 an der Signalvermittlung von Zelloberfläche zum Zellkern beteiligt sind, geleiten cyclinabhängige Proteinkinase und ihre Inhibitoren die Zelle durch den Zellzyklus. Nicht selten werden Störungen in der Synthese dieser Proteine bei Tumorzellen gefunden. Eine zentrale Rolle 30 spielt dabei das p53-Protein.

Proteine vom Typ des RB-Proteins regulieren die Verfügbarkeit entscheidender Transkriptionsfaktoren.

Die in Tumorgeweben hochregulierten Gene stellen meist den Ausgangspunkt für weitere detaillierte Analysen dar

5 und da Proteine verschiedenster Funktionen hochexprimiert werden, ist der Ansatz für therapeutische Interventionen sehr vielseitig. Es ist daher das Ziel der Krebsforschung weitere neue Zielmoleküle (sog. „Targets“) für therapeutische Interventionen zu finden,

10 die dann für eine gezielte Therapie mit geringen Nebenwirkungen benutzt werden können.

In erster Linie gilt es daher molekulare Veränderungen zwischen Normalgewebe und Tumor auf dem Niveau der Genexpression („Transkriptionslevel“) aufzudecken, die

15 einerseits neue Targets identifizieren sollen und andererseits für die Entwicklung bzw. das Auffinden von Substanzen zur Hemmung von Fehlfunktionen herangezogen werden können.

Eine ganze Reihe verschiedenster Methoden zur

20 Identifizierung und Charakterisierung von neuen Targets, die den Ausgangspunkt für die Entwicklung von neuen Therapeutika darstellen, basieren auf der Erstellung differenzieller mRNA Transkriptionsprofile zwischen Tumoren und Normalgeweben. Dazu zählen die

25 differenzielle Hybridisierung, die Erstellung von Subtraktions-*cDNA*-Banken ("representational difference analysis"; Hubank und Schatz, 1994; Diatchenko et al., 1996) und der Einsatz der DNA-Chip Technologie oder der SAGE-Methode (Velculescu et al., 1995).

Neben immuntherapeutischen Ansätzen kommt der gezielten Chemotherapie eine wesentliche Rolle bei der Behandlung von Krebs zu. Unter Chemotherapie versteht man die Verabreichung von Substanzen, die durch Eingriff in

5 Stoffwechsel, Signaltransduktion und Zellteilungsvorgänge maligner Zellen entweder zytostatisch oder zytotoxisch-zytolytisch wirken. Chemotherapeutika lassen sich auf Grund der Beeinflussung von spezifischen Targets in der

10 Tumorzelle, nach Art der zellulären Interaktion und der Wechselwirkung mit einer bestimmten Zellzyklusphase, in verschiedene Kategorien unterteilen.

Die Art der Krebsbehandlung hängt vom Tumorstadium ab, entscheidend ist dabei, ob bereits Metastasen vorhanden

15 sind und wie weit diese im Körper verbreitet sind. Die Applikation von Zellgiften zur Krebsbehandlung ist, neben operativen Maßnahmen und der Strahlentherapie, ein integraler Bestandteil der heutigen Therapiekonzepte in der Onkologie.

20 Im wesentlichen gibt es zwei Hauptziele der Chemotherapie: In erster Linie ist es die Heilung von Krebs; das bedeutet, dass der Tumor verschwindet und nicht mehr auftritt. Ist eine Heilung aus verschiedensten Gründen nicht mehr möglich, versucht man

25 den Tumor in seinem Wachstum und seiner Ausbreitung einzuschränken bzw. zu kontrollieren.

Prinzipiell entfalten Substanzen, die bei der Chemotherapie Anwendung finden, ihre Wirkung bei allen sich teilenden Zellen. Tumorzellen zeigen jedoch eine

30 höhere Empfindlichkeit gegenüber Chemotherapeutika als

gesunde Zellen, da hauptsächlich stark proliferierende Zellen angegriffen werden.

Jedes Gewebe hat ein charakteristisches Wachstumsverhalten, das Zellteilung, Wachstumsstillstand,

5 Differenzierung und Alterung umfasst und durch interne und externe Faktoren beeinflusst und reguliert wird.

Viele der heute eingesetzten zytotoxischen Chemotherapeutika wirken nur bei proliferierenden Zellen (nicht in der G0-Phase der Zellteilung). Dabei werden

10 allerdings sowohl Normal- als auch Krebszellen attackiert. Die Zerstörung von normalen Zellen kann zu starken Nebeneffekten führen; z.B. Zerstörung der Blutzellen-produzierenden Gewebe des Knochenmarks (Myelosuppression).

15 Chemotherapeutika werden je nachdem, wie sie spezifische Substanzen innerhalb der Tumorzelle beeinflussen, mit welchen zellulären Prozessen die Medikamente interagieren und welche Zellzyklusphase sie beeinflussen, in verschiedene Kategorien unterteilt.

20 Diese Informationen sind für Onkologen notwendig für die Entscheidung welche Präparate bei der Therapie miteinander kombiniert werden können.

Die in Tumorgeweben hochregulierten Gene stellen somit potentielle neue Zielstrukturen dar und da Proteine 25 verschiedenster Funktionen hochexprimiert werden, ist der Ansatz für therapeutische Interventionen sehr vielseitig.

Es ist daher das Ziel der Krebsforschung, weitere neue Targets für therapeutische Interventionen zu finden, die

dann für eine gezielte Therapie mit - verglichen mit derzeitig eingesetzten Therapeutika - geringeren Nebenwirkungen benutzt werden können.

In Tumorgeweben hochregulierte Gene stellen

5 Angriffspunkte und somit potentielle Zielstrukturen („Targets“) für die Chemotherapie dar.

Aufgabe der vorliegenden Erfindung war es, ein neues, bevorzugt von Tumorzellen exprimiertes Protein bereitzustellen, das ein Zielmolekül für die

10 Intervention mittels chemotherapeutischer Methoden darstellt.

Diese Aufgabe wurde gelöst, indem zunächst mittels RDA („representational difference analysis“) zwischen einer Lungen-Adenokarzinom-Zelllinie (A549) und

15 Normallungengewebe eine cDNA-Substraktionsbibliothek hergestellt wurde. Zur Selektion der im Tumor überexprimierten Antigene wurden anschließend die erhaltenen cDNA-Klone sequenziert und mit in Datenbanken verfügbaren Sequenzen verglichen. Unter den dabei 20 annotierten Genen befanden sich 321 unbekannte, zu denen größtenteils ESTs ("expressed sequence tags") -Einträge in der Datenbank existierten. Nach einer weiteren qualitativen PCR-Analyse in cDNA-Bibliotheken von kritischen Normalgeweben und immunprivilegierten Geweben 25 sowie detaillierteren Datenbankrecherchen wurde die Anzahl der Kandidatenklone auf 59 eingeschränkt, deren ESTs nicht aus kritischen Normalgeweben stammen.

Diese Klone wurden auf Incyte DNA Chips gespottet und mit einer ganzen Reihe von Tumorgeweben und

30 Normalgeweben als Referenz hybridisiert. Das mRNA

Expressionsprofil von EST Fragmenten, die in Krebsgeweben und Normalgeweben differentiell exprimiert werden und zu einem noch unbekannten Gen gehören, wurde mit unterschiedlichen Methoden verifiziert.

- 5 Die Länge der Transkripte wurde mittels Northern blot Analyse bestimmt und das Expressionsmuster in verschiedenen Zellsystemen durch quantitative PCR exakt charakterisiert. Nur unbekannte Gene bzw. ESTs mit tumorspezifischen Expressionsprofil wurden
- 10 weiterverfolgt und einer "full length Klonierung" unterworfen. Potentielle ORFs ("open reading frames") werden in die entsprechende Aminosäuresequenz umgewandelt und zur möglichen Funktionsvorhersage mittels *in silico* Strategien analysiert.
- 15 Die humane B345-cDNA wurde kloniert, die in einem ersten Klonierungsansatz erhaltene Sequenz ist in SEQ ID NO:1 dargestellt. Die Sequenzanalyse der in diesem Ansatz klonierten humanen B345-cDNA zeigte einen durchgehenden offenen Leserahmen von Position 215 bis Position 2461
- 20 (exklusive Stopcodon), der, auf Nukleotid- und Proteinebene, in den bekannten Sequenzen der Datenbanken keine Homologie oder Identität aufweist. Aus den aus Northern Blot Experimenten gewonnenen Daten ist zu schließen, dass das B345-Transkript eine Länge von ca.
- 25 6,5 kb hat. In einem ersten Ansatz wurde als klonierter Bereich eine B345-cDNA mit 5897 bp (exklusive polyA-Region), erhalten, wobei das Vorhandensein eines Polyadenylationssignals und des PolyA-Tails am 3'-Ende der Sequenz auf die Vollständigkeit der cDNA in diesem
- 30 Bereich hindeutete. Aufgrund der Tatsache, dass im 5'-Bereich der klonierten cDNA von Position 1 bis 214

kein durchgehender Leserahmen aufschien, wurde zunächst angenommen, dass es sich bei dem ATG an Position 215, die auch zu 75% einer Kozak Translationinitiationsstelle (ACCATGT) (Kozak, 1987) entspricht, um das Startkodon 5 von B345 handelt.

In einem weiteren Klonierungsansatz wurden mittels einer molekularbiologischen Standardmethode, und zwar mittels sog. „Promotor Finder DNA Walking“, zusätzliche Informationen über die weiter stromaufwärts liegende 10 Sequenz von B345 gewonnen.

Somit wurde die in dem ersten Klonierungsversuch erhaltene B345-Sequenz (SEQ ID NO:1) in der 5`Region erweitert. Der Transkriptionsstart konnte unter Anwendung der Primer Extension Analyse genau lokalisiert 15 werden und liegt bei Position 201 (SEQ ID NO:3). Durch wiederholte Sequenzierungen auch in der 3`Region wurde, im Vergleich zur in SEQ ID NO:1 dargestellten Sequenz, eine zusätzliche Base an Position 2430 gefunden, die zu einer Leserasterverschiebung führt und somit das 20 Stoppcodon von Position 2729 auf 2791 verschiebt. Die erhaltene cDNA (SEQ ID NO:3) besitzt einen offenen Leserahmen, der für ein potentielles Protein mit einer Länge von 836 Aminosäuren (SEQ ID NO:4) kodiert. Die 25 Translationsinitiationsstelle an Position 283 entspricht etwa zu 70% einer Kozak-Konsensussequenz.

Die Promotorregion 200bp upstream der mutmaßlichen Transkriptionsstartstelle enthält weder eine TATA noch eine CCAAT box, jedoch eine eindeutige GC-box, welche eine Bindungsstelle des SP1 Proteins darstellt. Die

Tatsache, dass der GC Gehalt in der 5`Region über 60% ist, deutet auf ein CpG Island hin (Bird, 1986).

Die resultierende primäre Aminosäuresequenz von B345 ist in SEQ ID NO:4 gezeigt. Die Analyse des Hydrophilizitäts 5 Plots der Aminosäuresequenz zeigt, dass das B345 Protein zwei charakteristische hydrophobe Domänen aufweist, die ein Signalpeptid und eine helikale Transmembrandomäne darstellen (Fig. 6). Diese polarisierte Struktur deutet darauf hin, dass es sich bei B345 um ein integrales 10 Membranprotein handelt.

Die extrazelluläre Domäne lässt auf die Existenz von definitiv einer, gegebenenfalls drei, CUB Domänen schließen. CUB Domänen kommen bei verschiedenen, meist während der Embryonalentwicklung regulierten Proteinen 15 vor. Eine kürzlich erschienene Publikation (Gerstein et al., 2000) demonstriert, daß CUB Domänen enthaltende Proteine die am ausgeprägtesten differenziell regulierten Proteine in *C. elegans* sind. Da Gene, die eine Schlüsselrolle in der Embryonalentwicklung haben, 20 entsprechende Funktionen, z.B. in der Zellteilung, der Zellproliferation oder Signalübertragung, in Krebs ausführen, kann angenommen werden, dass eine Überexpression von B345 in Zellen eine Veränderung in 25 den Eigenschaften der Substratadhäsion oder der extrazellulären Matrix bewirkt. Das B345 Protein weist 12 potentielle N-Glycosylierungsstellen auf, die in der mutmaßlichen extrazellulären Domäne zu finden sind.

Aufgrund seiner Aminosäuresequenz ist anzunehmen, dass das B345-Protein eine  $\beta$ -Sheet Sekundärstruktur

ausbildet, da sich CUB Domänen bekanntlich als  
β-Sandwich falten.

Die intrazelluläre Domäne (Bereich 691-836) weist keine  
signifikanten Homologien auf. Der gesamte C-Terminus  
5 zeigt jedoch eine Identität (82%) über 124 Aminosäuren  
mit einem EST (Acc No. AW063026) aus humanen  
Eierstockkrebs Zellen.

Ausgehend von den Funktionen anderer CUB Domänen  
enthaltender Proteine kann gefolgert werden, daß das  
10 B345 Transmembranprotein in der Kommunikation, der  
Interaktion und/oder der Signaltransduktion mit  
extrazellulären Komponenten oder Liganden eine Rolle  
spielt. Ferner sind die Daten der Expressionsanalyse ein  
starkes Indiz dafür, dass B345 beim metastatischen  
15 Prozess von Krebs, insbesondere Dickdarmkrebs, beteiligt  
ist.

Für die Aufklärung der physiologischen Funktion und der  
Rolle von B345 bei der Metastasierung sind folgende  
Untersuchungsmethoden geeignet:

20 Zunächst werden Zelllinien, vorzugsweise humane  
Zelllinien identifiziert, z.B. mittels TaqMan PCR, die  
B345 nicht endogen exprimieren. Die Zellen werden mit  
einem Plasmid, das die B345-Sequenz enthält,  
transfiziert und B345 exprimiert. Änderungen in der  
25 Morphologie und/oder dem Migrationsverhalten, das z.B.  
mittels Softagar Assay (Hamburger und Salmon, 1977) oder  
Migrationsassay (Liaw et al; 1995) der B345  
exprimierenden Zellen gegenüber den nicht-transfizierten  
Zellen deuten auf eine Rolle von B345 in dem dafür  
30 verantwortlichen biologischen Prozess hin. Dies ist ein

deutlicher Hinweis auf eine Beteiligung von B345 an der Interaktion von Tumorzellen untereinander und/oder mit der extrazellulären Matrix und somit auf eine Funktion bei der Metastasierung.

5 Alternativ bzw. zusätzlich zu dieser Funktionsanalyse wird in einem komplementären Ansatz die Expression von B345 in Zellen, die dieses Protein endogen exprimieren, unterdrückt, um ebenfalls die etwaige Änderungen in Morphologie und/oder Migrationsverhalten festzustellen.

10 Außerdem wird gegebenenfalls untersucht, ob Proteinkomponenten existieren, die mit B345 inter- oder extrazellulär interagieren (z.B. mittels Yeast Two Hybrid System (Fields und Song, 1989)).

Die Erfindung betrifft somit in einem ersten Aspekt ein  
15 tumorspezifisches Polypeptid mit der Bezeichnung B345, mit der in SEQ ID NO: 4 angegebenen Aminosäuresequenz oder ein Polypeptid, das von einem Polynukleotid kodiert wird, das unter stringenten Bedingungen mit einem Polynukleotid der in SEQ ID NO:3 dargestellten Sequenz  
20 oder einer Teilsequenz davon hybridisiert, sowie davon abgeleitete Proteinfragmente oder Peptide.

In einem weiteren Aspekt betrifft die vorliegende Erfindung ein isoliertes DNA-Molekül, kodierend für das tumorspezifische Polypeptid der Bezeichnung B345.

25 Bevorzugt ist das erfindungsgemäße DNA-Molekül ein Polynukleotid der in SEQ ID NO: 3 dargestellten Sequenz oder ein Fragment davon oder ein DNA-Molekül, das mit einem DNA-Molekül der in SEQ ID NO: 3 dargestellten

Sequenz oder einer Teilsequenz davon unter stringenten Bedingungen hybridisiert, oder ein Fragment davon.

Unter „stringenten Bedingungen“ wird z.B. verstanden:

Inkubation über Nacht bei 65°C – 68°C mit 6xSSC (1xSSC =

5 150 mM NaCl, 15 mM Tri-Natriumcitrat), 5xDenhardt's Lösung, 0.2%SDS, 50 µg/ml Lachsspermien-DNA, daran anschließend Waschen zweimal 30 min mit 2xSSC, 0.1% SDS bei 65°C, einmal 30 min mit 0.2xSSC, 0.1% SDS bei 65°C und gegebenenfalls abschließendes Spülen mit 0.1xSSC,

10 0.1%SDS bei 65°C, oder äquivalente Bedingungen.

Die erfindungsgemäßen DNA Moleküle kodieren für (Poly)peptide der Bezeichnung B345 mit der in SEQ ID NO:4 dargestellten Aminosäuresequenz bzw. für davon abgeleitete Proteinfragmente oder Peptide; damit sind

15 DNA Moleküle bzw. Fragmente mitumfasst, die durch die Degeneration des genetischen Codes Abweichungen von der in SEQ ID NO:3 dargestellten Sequenz aufweisen

In einer Ausführungsform der Erfindung betrifft die Erfindung ein isoliertes DNA-Molekül der in SEQ ID NO:3 dargestellten Sequenz oder ein Fragment davon, oder ein DNA-Molekül, das mit einem DNA-Molekül der in SEQ ID NO:3 dargestellten oder mit einer Teilsequenz davon hybridisiert, kodierend für das natürliche B345-Polypeptid bzw. für ein Fragment davon.

20 25 Die B345-DNA-Moleküle können in einer sog. DNA-Vakzine für die Immuntherapie von Tumoren verwendet werden.

Dabei können die B345-DNA-Moleküle der Erfindung, vorzugsweise in rekombinanter Form als Plasmide, direkt oder als Bestandteil eines rekombinanten Virus, oder

Bakteriums verabreicht werden. Prinzipiell kann jede gentherapeutische Methode für die Immuntherapie von Krebs auf Basis von DNA ("DNA-Vakzine") auf B345-DNA angewendet werden, und zwar sowohl *in vivo* als auch

5 *ex vivo*.

Beispiele für die *in vivo* Verabreichung sind die direkte Injektion von "nackter" DNA, entweder intramuskulär oder mittels Gen-Pistole ("gene gun") von der sich gezeigt

hat, daß sie zur Bildung von CTLs gegen Tumorantigene

10 führt. Beispiele für rekombinante Organismen sind

Vaccinia Virus, Adenovirus oder Listeria monocytogenes (eine Übersicht wurde von Coulie, 1997, gegeben).

Des Weiteren können synthetische Träger für Nukleinsäuren, wie kationische Lipide, Mikrosphären,

15 Mikrokügelchen oder Liposomen für die *in vivo*

Verabreichung von Nukleinsäure-Molekülen, kodierend für B345-Peptid verwendet werden. Verschiedene Hilfsstoffe, die die Immunantwort verstärken, können mitverabreicht werden, z.B. Zytokine, entweder in Form von Proteinen

20 oder dafür kodierenden Plasmiden. Die Applikation kann gegebenenfalls mit physikalischen Methoden, z.B. Elektroporation, kombiniert werden.

Ein Beispiel für die *ex vivo* Verabreichung ist die

Transfektion dendritischer Zellen, wie von Tuting, 1997,

25 beschrieben, oder anderer APCs, die als zelluläre Krebsvakzine zur Anwendung kommen.

Die vorliegende Erfindung betrifft somit in einem

weiteren Aspekt die Verwendung von Zellen, die B345

exprimieren, entweder von sich aus oder, in

30 gegebenenfalls modifizierter Form, nach Transfektion mit

der entsprechend kodierenden Sequenz, für die Herstellung einer Krebsvakzine.

Alternativ zur natürlichen B345-cDNA bzw. Fragmenten davon können modifizierte Derivate verwendet werden.

- 5 Diese umfassen Sequenzen mit Modifikationen, die für ein Protein(fragment) bzw. Peptide mit stärkerer Immunogenität kodieren, wobei für die Modifikationen auf DNA-Ebene dieselben Überlegungen gelten wie für die oben beschriebenen Peptide. Eine weitere Art der Modifikation
- 10 ist die Aneinanderreihung zahlreicher Sequenzen, kodierend für immunologisch relevante Peptide, nach Art einer Perlenschnur ("string-of-beads"; Toes et al., 1997). Die Sequenzen können auch durch Anfügung von Hilfselementen modifiziert werden, z.B. Funktionen, die
- 15 eine effizientere Abgabe und Prozessierung des Immunogens gewährleisten (Wu et al., 1995). Beispielsweise kann durch Anfügen einer Lokalisierungssequenz in das endoplasmatische Retikulum ("ER targeting sequence") die Prozessierung und damit
- 20 die Präsentation und letztlich die Immunogenität des Antigens erhöht werden.

Die vorliegende Erfindung betrifft in einem weiteren Aspekt ein rekombinantes DNA-Molekül, das B345-DNA enthält, z.B. verbunden mit einer regulatorischen

- 25 DNA-Sequenz, insbesondere einer heterologen regulatorischen DNA-Sequenz, z.B. einem Promoter oder Enhancer.

Die Erfindung betrifft in einem weiteren Aspekt Antikörper gegen B345 bzw. Fragmente davon. Polyklonale

- 30 Antikörper können in herkömmlicher Weise durch

Immunisierung von Tieren, insbesondere Kaninchen, mittels Injektion des B 345-Antigens bzw. Fragmenten davon, und anschließender Reinigung des Immunglobulins erhalten werden.

5 Monoklonale anti-B345-Antikörper können nach Standardprotokollen gemäß dem von Köhler und Milstein, 1975, beschriebenen Prinzip gewonnen werden, indem Tiere, insbesondere Mäuse, immunisiert, anschließend antikörperproduzierende Zellen der immunisierten Tiere  
10 immortalisiert werden, z.B. durch Fusion mit Myelomzellen, und der Überstand der erhaltenen Hybridome mittels immunologischer Standard-Assays auf monoklonale anti-B345-Antikörper gescreent wird. Für den therapeutischen oder diagnostischen Einsatz im Menschen  
15 können diese tierischen Antikörper gegebenenfalls auf herkömmliche Weise chimerisiert (Neuberger et al., 1984; Boulianne et al., 1984) oder humanisiert (Riechmann et al., 1988; Graziano et al., 1995) werden.

Humane monoklonale anti-B345-Antikörper (fragmente)  
20 können auch von sog. "Phage Display Libraries" (Winter et al., 1994; Griffiths et al., 1994; Kruif et al., 1995; Mc Guiness et al., 1996) und mittels transgener Tiere (Brüggemann et al., 1996; Jakobovits et al., 1995) gewonnen werden.

25 Die erfindungsgemäßen anti-B345-Antikörper können in immunhistochemischen Analysen für diagnostische Zwecke eingesetzt werden, oder als Therapeutikum in der Krebstherapie. (Ein Beispiel für die erfolgreiche Anwendung eines monoklonalen Antikörpers in der  
30 Krebstherapie ist Herceptin; ein Antikörper gegen das

Proto-Onkogen HER2. Herceptin kann in Brustkrebs-Patienten angewendet werden, die eine Überexpression von HER2 aufweisen.)

In einem weiteren Aspekt betrifft die Erfindung die

5 Verwendung von B345-spezifischen Antikörpern, um beliebige Substanzen selektiv zu bzw. in einen Tumor zu bringen, der B345 exprimiert. Beispiele für solche Substanzen sind zytotoxische Agenzien oder radioaktive Nuklide, deren Wirkung darin besteht, den Tumor Vorort zu schädigen. Aufgrund der relativ tumorspezifischen Expression von B345 sind dabei nur geringe Nebenwirkungen zu erwarten. In einem weiteren Aspekt können mit Hilfe von B345-Antikörpern Substanzen zur Sichtbarmachung von Tumoren, die B345 exprimieren,

10 15 herangezogen werden. Dies ist für die Diagnose und die Bewertung des Therapieverlaufs von Nutzen.

Therapeutische und diagnostische Anwendungen von Antikörpern, die für anti-B345-Antikörper in Frage kommen, sind in der WO 95/33771 beschrieben.

20 Das Protein der Bezeichnung B345 gemäß der vorliegenden Erfindung und die davon abgeleiteten Proteinfragmente, Peptide bzw. Peptid-Äquivalente oder Peptidomimetika können in der Krebstherapie eingesetzt werden, z. B. um eine Immunantwort gegen Tumorzellen zu induzieren, die

25 die entsprechenden Antigen-Determinanten exprimieren.

Vorzugsweise werden sie für die Therapie von B345-positiven Tumoren verwendet, insbesondere beim Lungen- und Kolonkarzinom.

B345 bzw. Peptide, Peptid-Äquivalente und

30 Peptidomimetika können für die Immuntherapie von Krebs

eingesetzt werden, wie z.B. in der WO 00/73438 beschrieben, auf deren Offenbarung hiermit Bezug genommen wird.

Es ist bekannt, dass tumorassoziierte Antigene 5 tumorspezifische Mutationen aufweisen können, die zu einer immunologischen Unterscheidung zwischen Tumor und Normalgewebe beitragen (Mandruzzato et al., 1997; Hogan et al., 1998; Gaudi et al., 1999; Wölfel et al., 1994). Um das Vorhandensein tumorspezifischer B345-Mutationen 10 festzustellen, wird, zweckmäßig mit Hilfe von Sonden aus der erfindungsgemäßen isolierten cDNA, die B345-cDNA aus einem oder mehreren unterschiedlichen Tumoren kloniert und die erhaltenen Sequenzen mit Normalgewebs-B345-cDNA verglichen. Es werden Versuche durchgeführt, die zeigen 15 sollen, ob Tumor-B345-Peptide aus einem gegenüber Normalgewebs-B345 mutierten Sequenzabschnitt im Vergleich zu Normalgewebs-B345-Peptiden aus dem entsprechenden Abschnitt eine verstärkte Immunogenität aufweisen. Um zu bestätigen, dass etwaige Mutationen 20 tumorspezifisch sind, können Antikörper gegen diese Bereiche generiert und Tumorzellen auf Expression von möglichen Mutationen untersucht werden.

Die vorliegende Erfindung betrifft somit in einem weiteren Aspekt B345-Peptide, abgeleitet von Bereichen 25 eines tumorexprimierten B345, die tumorspezifische Mutationen aufweisen.

Auf Grund der bevorzugten Expression von B345 in Tumorzellen kann angenommen werden, dass dieses Protein eine wichtige Funktion für den Tumor hat, z.B. für 30 Entstehung, Infiltration und Wachstum und somit ein

Target für die chemotherapeutische Intervention darstellt.

Im Hinblick auf seinen Einsatz als Target in der gezielten Chemotherapie wird B345 näher charakterisiert, 5 um die geeignete Strategie für die Intervention mit dieser Funktion zu entwickeln.

Als ersten Schritt bei der sog. "down-stream" Funktionsanalyse von B345 führt man zweckmäßig in einem ersten Schritt eine bioinformatische Analyse durch, die 10 den für die experimentelle Validierung von B345 als Target richtungweisend ist.

Für diese Analyse stellen die auf Ähnlichkeit und modularer Struktur beruhenden Bioinformatik-Konzepte eine wesentliche Grundlage dar. Etablierte 15 bioinformatische Hilfsmittel zur Feststellung von Ähnlichkeiten sind BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>, Altschul et al., 1997) oder FASTA (Pearson & Lipman, 1988), die spezialisierten Datenbanken wie Pfam 20 (<http://www.sanger.ac.uk/Pfam>, Bateman et al., 2000) und SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de>, Schultz et al., 2000), welche Domänenstrukturen berücksichtigen. Zur Verfeinerung der Analyse können Applikationen wie Clustal (<http://www2.ebi.ac.uk/clustalw>, Higgins et al., 25 1996) HMMer (<http://hmmer.wustl.edu>), PSI-BLAST (Altschul et al., 1997) und die PROSITE Datenbank (<http://www.expasy.ch/prosite>, Hofmann et al., 1999) herangezogen werden. Statistische Analysemethoden, die nicht auf Homologien beruhen, gestatten die Vorhersage 30 weiterer struktur- und funktionsrelevanter Eigenschaften

wie der Sekundärstruktur und des Auftretens von Transmembransegmenten und Helix-Turn-Helix-Motiven.

Methoden zur Vorhersage der Sekundärstruktur von Proteinen sind verfügbar; besonders erwähnenswert ist

5 Jpred (<http://barton.ebi.ac.uk/servers/jpred.html>, Cuff et al., 1998). Die Sekundärstrukturvorhersage kann Funktionshypothesen untermauern, etwa wenn die Struktur des vermuteten Homologen bekannt ist.

Gemäß Bioinformatikanalyse weist B345 eine helikale

10 Transmembrandomäne auf, wobei sowohl der N-terminale als auch der C-terminale Bereich hydrophile sind, was darauf schließen lässt, dass dieses Protein ein

Transmembranprotein darstellt. Der N-terminale, extrazelluläre Bereich besitzt einige CUB-Domänen,

15 welche zu Disulfidbrückenbildung neigen und daher bei der Dimerisierung bzw. bei Protein -Protein Wechselwirkungen beteiligt sind (Bork et al., 1993). Das C-terminale, intrazelluläre Ende zeigt Homologien zu einer Rezeptorkinase und zu einem C-Kinase Substrat.

20 In weiterer Folge wird B345 einer biochemischen und biologischen Analyse unterworfen.

In einem nächsten Schritt wird die Funktion von B345 für das Tumorgeschehen aufgeklärt; z.B. durch

Proliferationsassays *in vitro* oder in Tiermodellen, die

25 das zu untersuchende B345-Gen überexprimieren (konstitutiv oder induzierbar) und als Kontrolle entweder in deletierter (inaktiver) Form exprimieren oder über Antisense hinunterregulieren (siehe z.B. Grosveld und Kollia, 1992).

B345 kann in Screening-Assays verwendet werden, um Substanzen zu identifizieren, die die Aktivität dieses Proteins modulieren, insbesondere inhibieren. In einer Ausführungsform kann ein derartiger Assay z. B. darin bestehen, das B345 Protein, oder ein aktives Fragment davon, in Zellen, die auf die Aktivität von B345 mit Proliferation reagieren, einzubringen bzw. die entsprechende B345 cDNA in der Zelle zur Expression zu bringen, und die Proliferation der Zellen in Gegenwart 5 und in Abwesenheit einer Testsubstanz zu bestimmen.

Ein Beispiel für Testzellen sind Zellen mit niedriger Teilungsrate, z.B. primäre Zellen, die kein endogenes B345 aufweisen. Um die Eignung der Zellen für einen Screening-Assay festzustellen, werden diese mit 10 B345-cDNA transformiert, gezüchtet und mit Standard-Assays, z.B. Thymidin-Einbau, auf ihre Proliferationsfähigkeit getestet. Aufgrund einer nach B345-Expression signifikanten Erhöhung ihrer Proliferationseigenschaft können sie als Testzellen 15 eingesetzt werden, z.B. in High Throughput Screening Proliferationsassays. Beispiele für Proliferationsassays 20 im High Throughput Format, z.B. auf Grundlage des MTS-Assays, sind in der WO 98/00713 beschrieben.

Substanzen mit proliferationshemmender Wirkung können 25 zur Behandlung von Tumoren mit starker B345-Expression verwendet werden, insbesondere beim Lungen- und Klonkarzinom.

Figurenübersicht:

Fig. 1A: Expressionsprofil von B345, B452 und B540 in individuellen Lungenkarzinomen und Lungentumorzelllinien.

5 Fig. 1B: Expressionsprofil von B345 in normalem Dickdarmgewebe und Tumorzelllinien.

Fig. 1C: Graphische Darstellung des Alignments von B345, B452 und B540.

Fig. 2A: Northern Blot Analyse der Tumorzelllinie A549 mit einem 490bp langem B345 PCR-Produkt

10 Fig. 2B: Northern Blot Analyse verschiedener Normalgewebe mit einem 490bp langem B345 PCR-Produkt

15 Fig. 2C: Northern Blot Analyse verschiedener Krebsgewebe mit einem 318bp langen B345 PCR-Produkt

Fig. 3 mRNA Expressionsanalyse von B345 durch real-time PCR von Tumor- und Normal-Geweben.

20 Fig. 4: mRNA Expressionsanalyse von B345 durch real-time PCR von Laser-Mikroskop-präparierten Dickdarmtumoren (LCM) sowie normalem Dickdarmgewebe und Tumorzelllinien.

Fig. 5: Graphische Darstellung der Genstruktur von B345.

25 Fig. 6: Hydrophilizitäts-und Transmembran-Blot des B345-Proteins

Fig. 7: Potentielle Proteinstruktur von B345

**Tabellenübersicht**

5 Tab. 1: Zusammenfassung der Northern Blot Daten von  
B345 in verschiedenen Normalgeweben (1A),  
Krebszelllinien (1B); und verschiedenen  
Normalgeweben im Vergleich mit dem  
entsprechenden Tumorgewebe (1C)

10 Tab. 2A: Zusammenfassung der Daten der quantitativen  
PCR von B345 in verschiedenen Normal- und  
Krebsgeweben

15 Tab. 2B: Zusammenfassung der Daten der quantitativen  
PCR von B345 in verschiedenen Normalgeweben  
und mikrodissezierten Kolonadenokarzinom  
Geweben

**Zeichenerklärung**

+++ extrem positiv

++ stark positiv

20 + positiv

(+) schwach positiv

- negativ

**Beispiel 1**

RDA („Representational Difference Analysis“) von der humanen Adenokarzinom-Zelllinie der Lunge (A549) und normalem Lungengewebe

Die von ATCC bezogene humane Lungenadenokarzinom-Zelllinie A549 (CCL 185) wurde in T150 Zellkulturflaschen hochgezüchtet. Als Nährmedium diente MEM mit 10% hitze-inaktiviertem, fötalem Kälberserum und 2 mM L-Glutamin. Alle 3 bis 4 Tage wurden die Zellen durch Trypsinisieren 1:5 bis 1:10 zur Propagation gespalten. Nach Erreichen von etwa 80% Konfluenz wurden pro T150 Zellkulturflasche 4 ml einer Trypsinlösung (Angaben pro Liter: 8g NaCl, 0,2g KCl, 1,13g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-wasserfrei, 0,2g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 100ml 2,5% Trypsinlösung, 1g EDTA-Na-Salz; pH 7,2 - 7,4) zum Ernten der Zellen eingesetzt. Die 4 ml wurden in ein 15 ml Falconröhrchen transferiert, mit 8 ml PBS versetzt, bei 1200 rpm in einer Haereus Tischzentrifuge (Megafuge 2.0R) 5 min bei 4°C zentrifugiert, das Zellpellet mit 1 ml Lysis-Puffer (10mM Tris-HCl pH8, 140mM NaCl, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,5% NP40) versetzt, kräftig geschüttelt und in einem 2 ml Eppendorfgefäß bei 12 000 rpm und 4°C 5 min in einer Sigma Tischzentrifuge (Sigma 202 MK) abzentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Eppendorfgefäß transferiert und nach Zusatz von 55 µl 20% SDS-Lösung zweimal mit dem doppelten Volumen an einer CHCl<sub>3</sub>/Phenol (1:1 v/v) Mischung und einmal mit dem einfachen Volumen an CHCl<sub>3</sub> extrahiert. Die wässrige RNA-enthaltende Phase wurde mit 1/10 Volumen an 3M NaAc (pH5) und dem zweifachen Volumen an 96% EtOH versetzt und über Nacht bei -20°C die RNA präzipitiert. Ausgehend von 1 mg Gesamt-RNA wurde für die Isolierung von poly-A(+)RNA mittels des PolyATtract Kit (Promega) entsprechend dem Hersteller-Protokoll vorgegangen. Die

Lagerung der A549 poly-A(+)RNA mit einer Konzentration von 1 mg/ml in DEPC-behandeltem H<sub>2</sub>O erfolgte in Aliquots bei -80°C.

Zur Durchführung der repräsentativen Differenzanalyse

5 (RDA; Hubank and Schatz, 1994; Diatchenko et al., 1996) wurde die poly-A(+)RNA der Lungenadenokarzinom-Zelllinie A549 als „tester“, die von normalem Lungengewebe (1 mg/ml; Clontech, Palo Alto; #6524-1) als „driver“ eingesetzt. Die RDA wurde unter Verwendung des

10 PCR-select™ kit (Clontech, Palo Alto) entsprechend dem Hersteller-Protokoll durchgeführt, mit der Ausnahme, dass ein modifiziertes Primer/Adaptor-2-Oligonukleotidsystem zum Einsatz kam: Adaptor-2-alt-1 (SEQ ID NO:31) und nested-PCR-primer-2-alt (SEQ ID NO: 32) und Adaptor-2-alt-2 (SEQ ID NO: 33). Die neu generierten Primer/Adaptor-Sequenzen ermöglichen durch die Anwesenheit von drei neuen Restriktionsenzymeschnittstellen (Kpn I, Sac I und Xho I) in der Sequenz des nested-PCR-primer-2-alt nach

15 20 Klonierung der subtrahierten cDNA-Fragmente in den pPCRII-Vektor ein nachträgliches Herausschneiden der jeweiligen cDNA-Fragmente. Das Designen einer Primer/Adaptorsequenz mit mehreren verfügbaren Restriktionsenzymeschnittstellen war deshalb notwendig,

25 weil besonders in den Primersequenzen - bedingt durch die PCR-Amplifikationsschritte- oft Punktmutationen zu beobachten waren.

Nach der Synthese von doppelsträngiger cDNA mittels oligo-dT wurde die erhaltene cDNA von "tester" und

30 "driver" mit RsaI verdaut (RsaI ist ein 4-Basen erkennendes Restriktionsenzym und liefert im

statistischen Mittel 256 bp lange cDNA-Fragmente).

Gleiche Teile von "tester-cDNA" wurden entweder mit den Adaptoren 1 oder 2 ligiert und anschließend getrennt mit einem Überschuss an "driver-cDNA" bei 65°C hybridisiert.

5 Danach wurden die beiden Ansätze vereinigt und einer zweiten Hybridisierung mit frischer denaturierter "driver-cDNA" unterworfen. Die angereicherten "tester"-spezifischen cDNAs wurden anschließend durch PCR, mit für die Adaptoren 1 bzw. 2 spezifischen Primern,  
10 exponentiell amplifiziert. Für eine weitere Anreicherung wurde ein Aliquot dieser Reaktion einer zweiten PCR mit spezifischen nach innen versetzten ("nested") Primern unterworfen. Die aus dieser Reaktion resultierenden, exponentiell amplifizierten cDNA-Fragmente wurden direkt  
15 in den pCRII-Vektor (Invitrogen; "TA-cloning vector") ligiert und anschließend ein Drittel des Ligationsansatzes in kompetente *E. coli* (OneShot™, Invitrogen) transfiziert.

712 positive Transformanten (Blau-Weiß-Selektion) wurden  
20 erhalten und in 96-Napf Blöcken in LB-Amp Medium (1,3 ml pro Napf) für 48 h bei 37°C kultiviert. Pro Napf wurden 750 µl der *E. coli* Suspensionen für die Präparation der Plasmid-DNA eingesetzt (96-Napf- Minipräparationsmethode von QIAGen nach Vorschrift des Herstellers). Die  
25 verbleibenden Bakterienkulturen wurden als Glycerinstammkulturen bei -80°C gelagert.

Es wurde eine aus 712 Einzelklonen bestehende cDNA-Subtraktionsbibliothek erhalten, die sowohl in Form von *E. coli* Glycerin-Stammkulturen als auch in Form  
30 gereinigter Plasmide vorlag.

## Beispiel 2

## DNA-Sequenzierung und Annotation von TAA-Kandidaten

Die isolierte Plasmid-DNA sämtlicher 712 Klone (siehe  
5 Beispiel 1) wurde nach der Sanger-Methode auf einem  
ABI-377 Prism Gerät sequenziert. Die erhaltenen  
Sequenzen wurden mittels der BioScout-Software (LION,  
10 Heidelberg) annotiert und Datenbankvergleichen (Genbank)  
unterzogen. Von 712 Klonen konnten 678 sequenziert und  
annotiert werden. Der Rest (34) wies als Insert entweder  
nur poly(A) Sequenzen auf oder entsprach einem  
reliierten Vektor oder war nicht sequenzierbar. Von den  
678 annotierbaren Sequenzen erwiesen sich 357 als Gene  
mit bekannter Funktion. Die restlichen  
15 321 repräsentierten Klone, kodierend für Gene mit  
unbekannter Funktion; 59 davon wiesen nicht einmal  
Einträge in der humanen EST-Datenbank auf. Bekannte Gene  
wurden nicht weiter behandelt. Für jene unbekannten  
Gene, für die ein EST-Eintrag verfügbar war, wurde eine  
20 Abschätzung des Expressionsprofils vorgenommen: dabei  
wurden all jene ESTs mit > 95% Identität (BLAST), die  
zur entsprechend experimentell ermittelten Sequenz der  
Subtraktionsbibliotheken gehörten, überprüft. Bei der  
Annotation wurde eine Unterteilung in a) kritische  
25 Normalgewebe, b) fötale, "verzichtbare" und  
immunprivilegierte Gewebe und c) Tumore und Tumor-  
Zelllinien vorgenommen. Auf der Basis dieses "virtuellen  
mRNA-Profils" ("virtueller Northern blot") wurden  
200 Klone, für die keine ESTs in der Gruppe a) gefunden

wurden, für weitere experimentelle Analysen ausgewählt (inklusive der 59 Klone, für die keine EST-Eintragung vorlag). Zur weiteren Einengung der Kandidatenklone wurden aus den von den 200 ausgewählten Klonen 5 ermittelten Sequenzen Oligonukleotidprimerpaare entworfen und synthetisiert. Es wurden zunächst 8 verschiedene, von humanem Gewebe abgeleitete cDNA-Bibliotheken (GibcoBRL "SUPERSCRIPT™"), welche direktonal in pCMV-SPORT kloniert sind, mittels 10 qualitativer PCR auf das Vorhandensein der jeweiligen Kandidaten getestet. Die dabei eingesetzten cDNA-Bibliotheken stammten aus Gewebe von Herz (#10419-018), Leber (#10422-012), Leukozyten (#10421-022), Niere (#10420-016), Lunge (#10424-018), 15 Testis (#10426-013), Gehirn (#10418-010) und fötalem Gehirn (#10662-013). Die PCR-Bedingungen waren wie folgt: 20 µl Gesamtvolume pro PCR-Ansatz enthielten 1 x TaqPol-Puffer (50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl pH9, 0,1% Triton X-100), 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM dNTPs (Promega), 20 0,025 U/µl Taq-DNA-Polymerase (Promega), jeweils 5 pM an spezifischen Oligonukleotidprimer für B345 (B345-D, SEQ ID NO: 34) und (B345-U, SEQ ID NO: 35) sowie 100 ng der jeweils zu untersuchenden Plasmid-DNA. Zur Kontrolle wurden spezifische Primer für GAPDH (SEQ ID NO: 36 und 37) eingesetzt. Zur Überprüfung des selektiven Nachweises wurden die jeweiligen B345 spezifischen Primerpaare Oligonukleotidprimer (SEQ ID NO: 34) und (SEQ ID NO: 35) parallel auch auf das isolierte Plasmid mit dem B345 "original Fragment" hin ausgetestet 25 30 (ursprünglich isoliertes cDNA-Fragment von B345). Die

Nachweisbarkeit von Fragmenten der zu erwartenden Länge mit starkem Signal in einem der kritischen Normalgewebe (Herz, Leber, Lunge, Niere und Leukozyten), nicht jedoch in den cDNA-Bibliotheken aus immunprivilegierten Geweben

5 (Gehirn, fötales Gehirn und Testis) unter diesen PCR-Bedingungen (1 Zyklus: 3' 94°C; 35 Zyklen: 1' 94°C - 1' 55°C - 1' 72°C; 1 Zyklus: 7' 72°C) wurde als Ausscheidungskriterium definiert. Mittels dieser qualitativen PCR-Analyse konnte die Zahl der Kandidaten

10 auf 56 eingeengt werden; Klon B345 befand sich in dieser bereits vorselektionierten Kandidatengruppe.

## Beispiel 3

## Expressionsanalyse durch cDNA Chip Hybridisierung

Für das Design eines cDNA Chips wurden von der dBEST Datenbank über Nukleotid-Sequenzsuche eine Reihe von 5 Klonen ausgewählt, die zu verschiedenen Funktionskategorien, wie Apoptose bis zur Zellzyklus-Regulation, gehören. Insgesamt wurden 1299 IMAGE Klone (davon repräsentieren 1024 bereits bekannte Gene) bestellt und zur Kontrolle sequenziert.

10 Mikrotiterplatten mit Bakterien, die ca. 800 bp lange Sequenzen vom 3`Ende des Gens im Vektor enthalten, wurden an Incyte Pharmaceuticals, Inc. (USA) geschickt und diese dort auf 60 Chips gespottet. Neben diesen Klonen wurden auch 120 durch RDA identifizierten EST 15 Klone auf die Chips gespottet. Die so produzierten DNA Chips wurden anschließend mit Cy3 markierter cDNA aus Normalgewebe, Tumorgewebe und Zelllinien zusammen mit Cy5 markierter cDNA aus einer Mischung von neun verschiedenen Normalgeweben hybridisiert und die beiden 20 Signale zur Normalisierung der Expressionswerte verglichen. Die Berechnungen erfolgten teilweise in S-Plus oder in Microsoft Excel. Die Auswertung der Chip Experimente ergab ein sehr ähnliches Expressionsprofil für B345, B540 und B452 bei der Hybridisierung mit 25 Lungenkrebs Proben von Zelllinien und Patientenmaterial (Siehe Fig. 1A). Solch ein tumorassoziiertes Expressionsprofil konnte für B345 auch bei Vergleich von Kolon Adenokarzinom mit Kolon Normalgewebe gezeigt werden (Siehe Fig. 1B).

Das Sequenzalignement von B345, B540 und B452 zeigte eindeutig ein Überlappen der einzelnen EST Fragmente. Daher konnte man annehmen, dass es sich bei den drei Klonen um ESTs von ein und dem selben Gen handelt. Der daraus resultierende DNA Abschnitt deckt eine Länge von 843 bp ab (Siehe Fig. 1C) und wurde in weiteren Versuchen zur Durchsuchung von öffentlichen Datenbanken verwendet. Die Suchergebnisse lieferten keine signifikante Homologie zu bekannten DNA bzw. Protein Sequenzen, was darauf hindeutet, dass es sich bei B345 um ein bis lang unbekanntes Gen handelt.

#### Beispiel 4

##### Expressionsanalyse von B345 mittels Northern Blots

Bei B345 handelt es sich um ein Gen, das laut DNA Chip Analysen in Tumorgeweben (siehe Fig. 1A und 1B, Tab. 1a und Tab. 1B) hochreguliert ist.

Um einerseits das erhaltene Transkriptionsprofil zu bestätigen und andererseits die Länge der zu erwartenden mRNA für die full size Klonierung zu bestimmen, wurde für B345 eine Northern Blot Analyse unter Einsatz von humanen Zelllinien und des "Human Multiple Tissue Northern Blots" (Clontech und Invitrogen) durchgeführt.

Als Sonden dienten die mit  $[\alpha-32P]dCTP$  (NEN, Boston) markierten 490 bp bzw. 318bp langen PCR Produkte von B345 (Primer (SEQ ID NO:5 und SEQ ID NO:6 bzw. SEQ ID NO:7 und SEQ ID NO:8)). Die Hybridisierung erfolgte bei 68° für 2 h; die Visualisierung durch Standard-

Autoradiografie (Hyperfilm, Amersham). Fig. 2A, 2B und 5 2C sowie Tab. 1a und Tab. 1B, 1C zeigen das Ergebnis dieser Analyse: Fig. 2A von der Zelllinie A549, Fig. 2B von 12 Normalgeweben (Periphere Blut Lymphozyten (PBL), Lunge, Placenta, Dünndarm, Leber, Niere, Milz, Thymus, Kolon, Skelettmuskel, Herz und Hirn) und Fig. 2C von 10 8 Krebszelllinien (Promyelozytische Leukämie HL60, HeLa-S3, chronische myelogene Leukämie K-562, lymphoblastische Leukämie MOLT-4, Burkitt's Lymphom (Raji), Kolon Adenokarzinom SW480, Lungen Adenokarzinom A549 und Melanom G361). Das B345-Transkript zeigt eine Länge von 6,5 kb.

#### Beispiel 5

15 Analyse des Expressionsprofils von B345 auf RNA-Ebene mittels quantitativer RT-PCR (real time PCR oder TaqMan-Analyse)

Um eine exaktere Quantifizierung der mRNA Expression in 20 den verschiedenen normal und Tumorgeweben durchzuführen, wurde die "real time PCR" angewandt, die es erlaubt die RNA Konzentration im Vergleich zu einen externen Standard zu berechnen.

Die Isolierung der RNA aus Gefriergewebe erfolgte mit Trizol gemäß dem Herstellerprotokoll von Gibco. Zur 25 Entfernung von etwaig kontaminierender DNA wurde die präparierte RNA wie folgt mit DNAase I verdaut: 3 µg Gesamt-RNA wurden mit 20 µl 5x AMV Puffer (Promega), 1 µl RNasin (Promega) und 2 µl DNase I (Boehringer

Mannheim) in einem Gesamtvolumen von 80  $\mu$ l 15 Minuten bei 37°C inkubiert. 120  $\mu$ l Phenol : Chloroform : Isoamylalkohol (25:24:1) wurden zugegeben, auf einem Vortexer gemischt und kurz abzentrifugiert. Die wässrige 5 Phase wurde abgenommen, mit 120  $\mu$ l Chloroform: Isoamylalkohol (24:1) versetzt und wie vorher zentrifugiert. Die gereinigte RNA wurde Ethanol-gefällt und in Wasser gelöst.

10 Anschließend wurde die Gesamt-RNA mit reverser Transkriptase (Superscript, Gibco, BRL) in cDNA umgeschrieben: Zu 3  $\mu$ g Gesamt-RNA wurden 1  $\mu$ l Oligo dT primer (Promega) zugegeben und mit Wasser auf ein Endvolumen von 10  $\mu$ l gebracht. Nach einer Inkubation von 5 Minuten bei 70°C wurde die Lösung 5 Minuten bei 15 Zimmertemperatur abgekühlt. 5  $\mu$ l RT reaction buffer (5x, Gibco, BRL), 2,5  $\mu$ l dNTPs (je 10 mM, Boehringer Mannheim), 1  $\mu$ l RNasin (10U/ $\mu$ l, Promega), 1,5  $\mu$ l Superscript (10 U/ $\mu$ l, Gibco, BRL) und 5  $\mu$ l Wasser wurden zugegeben und 1 Stunde bei 42°C inkubiert und die 20 Reaktion durch Inkubation von 3 Minuten bei 95°C beendet.

25 Zur Herstellung eines cDNA-pools eines bestimmten Gewebe oder Tumortyps wurden 3 bis 10 verschiedene Einzelpräparationen von unterschiedlichen Patienten in gleichen Anteilen gemischt.

Die quantitative Bestimmung der "Haushaltsgene"  $\beta$ -Aktin, GAPDH und Tubulin in cDNA-pools wurde wie folgt durchgeführt:

A)  $\beta$ -Actin-TaqMan PCR (Perkin Elmer)

Details über das Prinzip der TaqMan Methode siehe Herstellerinformation (Perkin Elmer). Ein TaqMan PCR Lauf beinhaltete Proben an  $\beta$ -Actin-Kontrollsequenz mit 5 je  $10^2$ ,  $10^3$ ,  $10^4$ ,  $10^5$  und  $10^6$  Kopien/ $\mu$ l (Perkin Elmer) zur Bestimmung der Standardkurve, eine Negativkontrolle ohne DNA und die zu quantifizierenden cDNA-pools. Alle Proben wurden in Triplikaten analysiert. Für einen 25  $\mu$ l Reaktionsansatz wurden 1  $\mu$ l cDNA, 2,5  $\mu$ l 10x Puffer A 10 (Perkin Elmer), 4  $\mu$ l MgCl<sub>2</sub> (25 mM, (Perkin Elmer)), 0,5  $\mu$ l je Nukleotid (10 mM dATP, dCTP, dGTP; 20 mM dUTP), 0,125  $\mu$ l TaqMan Sonde (20  $\mu$ M; TaqMan Sonde für  $\beta$ -Aktin (SEQ ID NO: 20 fluoreszenzmarkiert am 5'-Ende mit 6-Carboxyfluorescein und mit 15 6-Carboxytetramethylrhodamine am 3'-Ende), 1  $\mu$ l je  $\beta$ -Aktin spezifischer Primer (je 20  $\mu$ M, Forward Primer SEQ ID NO:21 und Reverse Primer SEQ ID NO:22), 0,25  $\mu$ l AmpErase uracil N-Glycosylase "UNG" (1 U/ $\mu$ l, Perkin Elmer), und 0,125  $\mu$ l AmpliTaq Gold (5 U/ $\mu$ l, Perkin 20 Elmer) gemischt, in MicroAmp Optical Tubes (Perkin Elmer) überführt und mit MicroAmp Optical Caps verschlossen. Die PCR wurde folgendermaßen durchgeführt: ein Zyklus mit 2 Minuten 50°C für die UNG Reaktion, ein Zyklus 10 Minuten 95°C zur Aktivierung der AmpliTaq, 25 40 Zyklen mit je 15 Sekunden 95° und 1 Minute 60°C. Anschließend wurden die Proben auf 25°C gehalten. Die Auswertung der Daten erfolgt mit dem Programm "Sequence Detection System 1.5b1" (PE Applied Biosystems), wobei im Prinzip die Fluoreszenzsignale der zu 30 quantifizierenden cDNA-Proben mit den Signalen der

Kontrollplasmidverdünnungen bekannter Konzentration verglichen wurden.

B) GAPDH-TaqMan PCR

Für die Quantifizierung von GAPDH, das wie  $\beta$ -Aktin oder 5 Tubulin zur Normalisierung der eingesetzten RNAs verwendet wurde, sind folgende Primer bzw. Sonden eingesetzt worden. Als TaqMan Sonde für GAPDH diente (SEQ ID NO: 23) eine am 5'-Ende mit Tetrachlorfluorescein und am 3'-Ende mit 10 Carboxymethylrhodamin markierte Sonde (Forward GAPDH Primer: SEQ ID NO: 24 und Reverse Primer: SEQ ID NO:25). Die Reaktionen wurden wie oben beschrieben durchgeführt.

C) Tubulin-SybrGreen PCR (Perkin Elmer)

Prinzip der SybrGreen PCR siehe Herstellerinformation 15 (Perkin Elmer). Ein SybrGreen PCR Lauf beinhaltete Proben an Tubulin-Kontrollplasmid mit je  $10^2$ ,  $10^3$ ,  $10^4$ ,  $10^5$  und  $10^6$  Kopien/ $\mu$ l (Perkin Elmer) zur Bestimmung der Standardkurve, eine Negativkontrolle ohne DNA und die zu quantifizierenden cDNA-pools. Alle Proben wurden in 20 Triplikaten analysiert. Für einen 25  $\mu$ l Reaktionsansatz wurden 1  $\mu$ l cDNA, 2,5  $\mu$ l 10 $\times$  SybrGreen Puffer (Perkin Elmer), 3,5  $\mu$ l MgCl<sub>2</sub> (25 mM, Perkin Elmer) ), 0,5  $\mu$ l je Primer (je 20  $\mu$ M, Perkin Elmer, Tubulin Forward (SEQ ID NO:26); Tubulin reverse (SEQ ID NO:27), 0,25  $\mu$ l AmpErase 25 uracil N-Glycosylase "UNG" (1 U/ $\mu$ l, Perkin Elmer), und 0,25  $\mu$ l AmpliTaq Gold (5 U/ $\mu$ l, Perkin Elmer) gemischt, in MicroAmp Optical Tubes (Perkin Elmer) überführt und mit MicroAmp Optical Caps verschlossen. Die PCR wurde

folgendermaßen durchgeführt: ein Zyklus mit 2 Minuten 50°C für die UNG Reaktion, ein Zyklus 10 Minuten 95°C zur Aktivierung der AmpliTaq, 40 Zyklen mit je 15 Sekunden 95° und 1 Minute 60°C. Anschließend wurden die 5 Proben auf 25°C gehalten. Die Auswertung der Daten erfolgt mit dem Programm "Sequence Detection System 1.5b1" (PE Applied Biosystems), wobei im Prinzip die Fluoreszenzsignale der zu quantifizierenden cDNA-Proben mit den Signalen der Kontrollplasmidverdünnungen 10 bekannter Konzentration verglichen wurden.

D) B345-TaqMan PCR

Die quantitative TaqMan-PCR-Analyse von B345 wurde, wie für die "Haushaltsgene" beschrieben, durchgeführt. Es wurden jedoch B345 spezifische Primer (SEQ ID NO:28 und 15 SEQ ID NO:29) (200 ng/μl) und eine B345 spezifische Sonde (SEQ ID NO:30, 20 μM), die am 5'-Ende mit Tetrachlorfluorescein und am 3'-Ende mit Carboxymethylrhodamin markiert ist, verwendet. Als Standard wurde das PCR Produkt von B345 mit den Primern 20 SEQ ID NO:28 und SEQ ID NO:29 mit bekannter Kopienzahl eingesetzt.

Fig. 3 veranschaulicht die TaqMan- Expressionsanalyse (Fig. 3A: β-Actin; Fig. 3B: Tubulin). Es zeigte sich, dass B345 höher in Dickdarmkrebsgewebe als in 25 Normalgewebe exprimiert ist (siehe Tab. 2a). Nun stellt aber sowohl das Normalgewebe als auch das Tumorgewebe ein sehr heterogenes Gemisch von verschiedenen Zelltypen dar. Weiteres variiert der Anteil von Tumorzellen im Tumorgewebe sehr stark von etwa 30 bis 80%. Um diese

biologische Heterogenität auf ein Minimum zu beschränken, wurden die Epithelzellen des Dickdarms, die die Ursprungszellen des Adenokarzinoms darstellen, und die Krebszellen oder Krebsareale durch Laser-

5 Mikrodissektion spezifisch präpariert. Gewebeschnitte von  $10\mu\text{m}$  Stärke wurden mit dem Kyromikrotom von Leica, Jung CM1800 angefertigt und auf einen mit Polyethylen beschichteten Objektträger aufgebracht (Böhm et al., 1997). Die bei Raumtemperatur für etwa 30 Minuten

10 getrockneten Schnitte wurden mit Mayers Hämatoxylin (SIGMA DIAGNOSTICS) inkubiert und anschließend zur Entfernung von unspezifisch gebundenen Farbstoff fünf Minuten unter fließendem Wasser gewaschen. Nach fünf minütigem Trocknen bei  $37^\circ\text{C}$  wurde die Laser-

15 Mikrodissektion durchgeführt. Dafür wurde das Lasermikroskop von PALM (PALM GmbH, Bernried, Deutschland) eingesetzt und etwa 2000 bis 5000 Zellen präpariert. Die durch Reverse Transkription gewonnene cDNA, wurde auch hier durch Real Time PCR analysiert.

20 Das Ergebnis zeigt, dass die B345 Expression in Dickdarmkarzinom Zelllinien sowie in Patientenmaterial um ein Vielfaches höher ist als vergleichsweise die des Dickdarmnormalgewebes. Zur Normalisierung wurde der Expressionslevel von GAPDH bestimmt (siehe Fig. 4 und

25 Tab. 2B).

## Beispiel 6

## a) Klonierung der cDNA von B345

Das Durchsuchen von Datenbanken nach Sequenzen von Genfragmenten (ESTs, expressed sequence tags), die für 5 die „in silico“ Klonierung von B345 herangezogen werden können, ergab ein überlappendes EST-Kontig von etwa 1500 bp. Der polyA-Bereich an einem der Enden gab Hinweis auf die Orientierung des DNA Abschnittes in Bezug auf 5' - 3' Orientierung, was beim Design von 10 neuen Primern für die Amplifikation von B345- spezifischen cDNA-Fragmenten essentiell ist.

Zunächst wurde das durch die Datenbankanalyse beschriebene potentielle 3' Ende durch experimentelle Ansätze verifiziert. RNA von der Lungen-Karzinom 15 Zelllinie Calu 6 (AACC No. HTB56) wurde mit Hilfe des Primers (SEQ ID NO:9) revers transkribiert und die resultierende einzelsträngige cDNA wurde mittels PCR mit den Gen spezifischen Primer SEQ ID NO:5 und den Adapterprimer SEQ ID NO: 10 amplifiziert.

20 Für einen 25 µl PCR Ansatz wurden 1 µl des cDNA-pools mit 2,5 µl 10×Taq Puffer (Promega), 1,5 µl MgCl<sub>2</sub> (25 mM, Promega), 0,5 µl dNTPs (je 10 mM, Boehringer Mannheim), 1 µl Primermischung (je 20 µM), 0,15 µl Taq Polymerase (Promega) in Wasser gemischt. Die PCR wurde wie folgt 25 durchgeführt: 1× 94°C 3 Minuten; 30× 94°C 30 Sekunden, 55°C 30 Sekunden, 72°C 1 Minute; auf 4°C halten. Die PCR wurde auf einem 1,2% Agarosegel analysiert.

Die beiden Primer wurden anschließend zum Sequenzieren des gereinigten PCR Produktes verwendet. Die ermittelten Sequenzen zeigten eine hohe Homologie mit dem "in silico" klonierten DNA Abschnitt (inklusive des PolyA-Trakts).

Da das Klonieren von 5'-Endsequenzen einen meist sehr aufwendigen Prozess darstellt, wurden im Folgenden zur Lösung des Problems verschiedene Methoden angewandt.

Als Ausgangszelllinie wurde auch hier Calu 6 verwendet.

10 Nach der reversen Transkription der RNA mit dem Primer SEQ ID NO:9 und der Zweitstrangsynthese wurde an die Doppelstrang-cDNA ein Linker bestehend aus den beiden Oligos SEQ ID NO:11 und SEQ ID NO:12 ligiert (Abe et al., 1992). Die daraus resultierende LoneLinker cDNA Bibliothek wurde dann mit dem Gen spezifischen Primer SEQ ID NO:6 linear über 35 Zyklen amplifiziert. Ein Aliquot der B345 angereicherten cDNA konnte anschließend mit den Primern SEQ ID NO:13 und LLEcoRIA SEQ ID NO:11 weiter amplifiziert werden. Nach der Gelelektrophorese eines Aliquots und Southernanalyse mit dem genspezifischen Oligo SEQ ID NO:14 konnte eine 5 kb Bande lokalisiert werden. In weiterer Folge wurde dieses Fragment schrittweise sequenziert und auf die Sequenz des EST-Kontigs ausgerichtet ("aligned").

25 Um die resultierende Sequenz aus der LLcDNA Klonierung zu überprüfen, wurden zwei Fragmente mittels PCR (SEQ ID NO:15 und SEQ ID NO:16 bzw. SEQ ID NO:6 und SEQ ID NO:17) amplifiziert und für das Screenen von Lambda gt10 cDNA Phagen Bibliotheken eingesetzt. Positive Plaques wurden isoliert und mittels den gt10 spezifischen

Primern (SEQ ID NO:18 und SEQ ID NO:19) PCR amplifiziert. Anschließende Sequenzierung und das Alignment mit den Sequenzen führte zu der Annahme, das es sich hierbei um ein differenzielles Spleißprodukt handelt. Die Spleißdonor, Akzeptor und Lariatsequenz konnten in weiterer Folge gefunden werden. Mittels PCR durch geeigneter Primerkombination wurde in verschiedenen Zelllinien nach differenziellen Spleißprodukten gesucht, wobei in allen gescreenten Zelllinien nur ein Produkt gefunden wurde und zu der in Fig. 5 dargestellten Genstruktur führte. Die angeführte cDNA besitzt einen offenen Leserahmen (ORF) der für ein potentielles Protein mit einer Länge von 749 Aminosäuren kodiert. Die Translationsinitiationsstelle an Position 215 entspricht zu etwa 75% einer Kozak-Konsensussequenz. Die in diesem Experiment erhaltenen Ergebnisse veranlassten dazu, in einem weiteren Experiment (Beispiel 6b) die Transkriptionsinitiationsstelle noch exakt durch Primer-Extension zu bestimmen, um sicher zu gehen, dass das hier ermittelte 5' Ende das tatsächliche 5'-Ende von B345 ist. Die von der in diesem Klonierungsversuch erhaltenen cDNA (SEQ ID NO:1) abgeleitete Aminosäuresequenz von B345 ist in SEQ ID NO:2 gezeigt.

25 b) Zweiter Klonierungsversuch; Bestimmung der 5'-und der Promotorregion von B345

Mit Hilfe des Promotor Finder DNA Walking Kit (Clontech) und anschließender Primerextension Reaktion wurden die 5'-Region und die Promotorregion sowie die exakte 30 Transkriptionsinitiationsstelle bestimmt. Die 5'-Region

wurde mit Hilfe einer genomischen DNA Library von Clontech mit B345 spezifischen Primern (SEQ ID NO:38 bzw. nested SEQ ID NO:39) und Adaptor Primer im Kit amplifiziert. Um den exakten Transkriptionsstart zu bestimmen, wurde die Primer Extension Reaktion durchgeführt. Dafür wurde der Primer SEQ ID NO:40 am 5`-Ende mit Hilfe 10 U der T4 Polynukleotid Kinase (Promega) und 3 $\mu$ l [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]ATP (3000Ci/mmol) nach Standard-Protokollen markiert (Sambrook et al., 1989). Das markierte Oligonukleotid wurde durch Präzipitation gereinigt. Für die Primerextension Reaktion wurden 10.000 cpm Oligonukleotid in einem Gesamtvolumen von 20  $\mu$ l zu 25  $\mu$ g Total RNA der Colo 205 Zelllinie (ATCC:CCL-222) eingesetzt.

Die RNA der Zelllinie wurde mit dem radioaktiv markiertem Primer revers transkribiert und auf ein 10%- Polyacrylamidgel aufgetragen. Zur Bestimmung der genauen Bandenlänge wurde ein PCR Fragment von nt 1000 - nt 1362 mit <sup>35</sup>S markierten Nukleotiden sequenziert und ebenfalls aufgetragen. Das aus der Elongation des reversen Primers resultierende Fragment von 209 Nukleotiden legt den Transkriptionsstart genau an Position 201 fest. Somit wurde die in Beispiel 6a erhaltene B345-Sequenz in der 5`Region erweitert und ein neues Startkodon auf Position 283 bestimmt. Durch wiederholte Sequenzierungen auch in der 3`Region wurde, im Vergleich zur in SEQ ID NO:1 dargestellten Sequenz, eine zusätzliche Base an Position 2430 gefunden, die zu einer Leserasterverschiebung führt und somit das Stoppcodon von Position 2729 auf 2791 verschiebt. Die in diesem Versuch erhaltene cDNA (SEQ ID NO:3) besitzt einen offenen Leserahmen, der für ein potentielles

Protein mit einer Länge von 836 Aminosäuren (SEQ ID NO:4) kodiert.

### Beispiel 7

#### 5 Bioinformatik-Analyse zur Funktion von B345

Die resultierende primäre Aminosäuresequenz von B345 ist in SEQ ID NO:4 gezeigt. Die Analyse des Hydrophilizitäts Plots der Aminosäuresequenz mit der Methode von Kyte und Doolittle (1982) zeigt, dass das B345 Protein zwei charakteristische hydrophobe Domänen aufweist (Aminosäuren Pos. 1 - 29 und 666 - 691), die ein Signalpeptid und eine helikale Transmembrandomäne darstellen (Fig. 6). Diese polarisierte Struktur deutet darauf hin, dass es sich bei B345 um ein integrales Membranprotein handelt. Die Transmembranhelix verbindet einen etwa 666 Aminosäuren langen extrazellulären und einen kurzen (145 Aminosäuren) intrazellulären Teil (siehe Fig. 7).

Die extrazelluläre Domäne weist außerdem klare Indizien für die Existenz einer CUB Domäne bei Position 220 - 350 sowie Indizien für 2 mögliche weitere CUB Domänen im Bereich der Aminosäuren 425 - 660 auf. CUB Domänen kommen bei verschiedenen, meist während der Embryonalentwicklung regulierten Proteinen vor. Außerdem sind manchmal bei EGF (Epidermal Growth Factor)-ähnlichen Domänen auch CUB Domänen anzutreffen. Eine kürzlich erschienene Publikation (Gerstein et al., 2000) demonstriert, daß CUB Domänen enthaltende Proteine die am ausgeprägtesten differenziell regulierten

Proteine in *C. elegans* sind. Da Gene, die eine Schlüsselrolle in der Embryonalentwicklung haben, auch analoge Funktionen in Krebs ausführen, kann angenommen werden, dass eine Überexpression von B345 in Zellen eine

5 Veränderung in den Eigenschaften der Substratadhäsion oder der extrazellulären Matrix bewirkt. Das Protein weist außerdem 12 potentielle N- Glycosylierungsstellen auf, die in der vorhergesagten extrazellulären Domäne zu finden sind, was mit der vorhergesagten Orientierung des

10 Proteins übereinstimmt.

Mit einem BLAST hit (E-value:  $5.8 \times 10^{-2}$ ) für den Bereich der Aminosäuren von 235 bis 282 von B345 konnte eine Komplement aktivierende Komponente des *RA-reactive factor* (RARF) aus *mus musculus* identifiziert werden. Das

15 Alignment befindet sich innerhalb der CUB Domäne 1 von B345.

Die CUB-Domänen 2 and 3 (Bereich 425-535 und 545-660) weisen marginale Homologien zu dem humanen und Fugu Prokollagen C-Proteinase Enhancer Protein (PCOLCE) auf.

20 Diese Regionen kommen in dem Bereich von PCOLCE vor, welcher ein CUB Domänen Tandem Repeat enthält (E-values: 0.5 (human) und 2.7 (Fugu)). CUB Domänen kommen manchmal in Repeats vor.

Vermutlich bildet das B345-Protein eine  $\beta$ -Sheet

25 Sekundärstruktur, da sich CUB Domänen bekanntlich als  $\beta$ -Sandwich falten.

Die intrazelluläre Domäne (Bereich 691-836) weist keine signifikanten Homologien auf. Der gesamte C-Terminus aligned jedoch mit einem EST (AW063026) von humanen

Eierstockkrebs Zellen (82% Identität über 124 Aminosäuren).

Beispiel 8

5 Bestimmung der genauen Genstruktur von B345

Zunächst wurden Bac Klone in öffentlichen Datenbanken (BLAST search) gesucht, die das B345-Gen enthalten. Die Bac Klone Ac068625 und Ac010170 enthielten einen

Großteil des Gens. Mit intronspannenden Primern wurden

10 Spliceakzeptor und Donorsequenzen in Colo 205 cDNA und genomischer DNA als Template gesucht. Das PCR Protokoll wurde wie folgt durchgeführt: 1x 95°C 2 Minuten, 35x 95°C 15 Sekunden, 68°C 3 Minuten und dann auf 4°C gehalten. Die PCR wurde auf einem 1,2% Agarosegel 15 analysiert und dabei die Längen der PCR Produkte der 2 Templates mit gleichen Primerkombinationen verglichen. Es stellte sich heraus, dass B345 aus 8 Exons, getrennt von 7 Introns besteht (Fig. 5).

Die chromosomale Lokalisation des Gens wurde mittels

20 Fluoreszenz-in situ-Hybridisierung (FISH) bestimmt.

Dabei wurde die humane, Digoxigenin-markierte B345 Sonde zusammen mit der Biotin-markierten Sonde von B47a2 (Knight et al., 1997), welche sich auf der sub-

telomerischen Region des Chromosomenarms 3p befindet,

25 mit Metaphase-Chromosomen zweier "normaler" Individuen hybridisiert (Lichter et al., 1988). Die hybridisierte Digoxigenin-Sonde wurde mittels Anti-Schaf-Dig (Boehringer Mannheim FRG) und Kaninchen Anti-Schaf FITC-markierten Antikörpern detektiert. Die Biotin markierte

Probe dagegen wurde mit Maus Anti-Biotin und Kaninchen-Anti-Maus (TRITC) und anschließende Färbung mit DAPI sichtbar gemacht. Die FISH Resultate zeigen, dass eine Mehrheit der Metaphasen eindeutige Signale an einem oder 5 beiden Chromatiden des Chromosoms 3 in der Region p21-p23 haben. Als Bestätigung der Position diente die Co-lokalisation der B47a2 (TRITC)-Sonde auf dem selben chromosomal Arm.

Tab. 1A

| Gewebe        | Expression |
|---------------|------------|
| PBL           | -          |
| Lunge         | ++         |
| Plazenta      | +          |
| Dünndarm      | +          |
| Leber         | -          |
| Niere         | ++         |
| Milz          | -          |
| Thymus        | -          |
| Kolon         | +          |
| Skelettmuskel | -          |
| Herz          | -          |
| Hirn          | -          |

Tab. 1B

| Zelllinie                           | Expression |
|-------------------------------------|------------|
| promyelocytische Leukämie HL60      | -          |
| HELA Zellen S3                      | -          |
| Chronische Myelogene Leukämie K-562 | +          |
| Lymphoblastische Leukämie MOLT-4    | -          |
| Burkitt's Lymphom (Raji)            | -          |
| Kolon Adenokarzinom SW480           | +++        |
| Lungen Adenokarzinom A549           | +          |
| Melanom G361                        | -          |

Tab. 1C

| Gewebe             | Expression |
|--------------------|------------|
| Speiseröhre Tumor  | (+)        |
| Speiseröhre Normal | (+)        |
| Magen Tumor        | -          |
| Magen Normal       | +          |
| Kolon Tumor        | +++        |
| Kolon Normal       | ++         |
| Mastdarm Tumor     | +          |
| Mastdarm Normal    | (+)        |

Tab. 2A

| Gewebe              | Expression B345 /<br>Actin | Expression B345 /<br>Tubulin |
|---------------------|----------------------------|------------------------------|
| Lunge Adenokarzinom | +                          | +                            |
| Lunge Adenokarzinom | +                          | +                            |
| Lunge Normal        | - bis (+)                  | (+)                          |
| Kolon Adenokarzinom | ++                         | ++                           |
| Kolon Adenokarzinom | +++                        | +++                          |
| Kolon Normal        | - bis (+)                  | +                            |
| Mamma IDC           | +                          | +                            |
| Brust               | -                          | -                            |
| Hodgkin's Lymphom   | -                          | -                            |
| Milz                | -                          | -                            |
| Testis              | -                          | -                            |

Tab. 2B

| Zelllinien und Gewebe        | Expression B345 / GAPDH |
|------------------------------|-------------------------|
| Kolon Adenokarzinom SW480    | +                       |
| Kolon Normal (Clonetech)     | (+)                     |
| Kolon Normal (Invitrogen)    | (+)                     |
| Lungen Adenokarzinom A549    | (+)                     |
| Kolon Adenokarzinom Colo 205 | +++                     |
| PG 102142 Tumor (Colon Ac.)  | +++                     |
| PG 21900 Tumor (Colon Ac.)   | ++                      |
| PG 7066 Tumor (Colon Ac.)    | +++                     |
| PG 32389 Tumor (Colon Ac.)   | ++                      |

## Literatur

Abe, K., Rapid isolation of desired sequences from lone linker PCR amplified cDNA mixture: application to  
5 identification and recovery of expressed sequences in cloned genomic DNA. *Mamm. Genome* 2, 252-259

Altschul, S. F., Madden, T. L., Schäffer, A. A., Zhang,  
J., Zhang, Z., Miller, W. and Lipman, D. J. Gapped  
BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein  
10 database search programs. *Nucleic Acids Res.* 25,  
3389-3402 (1997).

Bateman, A., Birney, E., Durbin, R., Eddy, S. R., Howe,  
K. L. and Sonnhammer, E. L. The Pfam Protein Families  
Database. *Nucleic Acids Res.* 28, 263-266 (2000).

15 Bird, A. P. (1986). CpG-rich islands and the function  
of DNA methylation. *Nature* 321:209-213.

Bork, P. et al. (1993). The CUB domain. A widespread  
module in developmentally regulated proteins. *J.Mol.*  
Biol. 231: 539-545

20 Boulianne, G. L., et al., (1984), *Nature* 312: 643-646  
Böhm et al., A.J. of Pathology 151,1:63-67, 1997

Brüggemann, M. und Neuberger, M.S., (1996), *Immunol.*  
Today 17: 391-397

Cuff, J. A., Clamp, M. E., Siddiqui, A. S., Finlay, M.  
25 and Barton, G. J. Jpred: a consensus secondary

structure prediction server. *Bioinformatics* 14, 892-893 (1998).

5 Diatchenko, L., Lau, Y.F., Campbell, A.P., Chenchik, A., Moqadam, F., Huang, B., Lukyanov, S., Lukyanov, K., Gurskaya, N., Sverdlov, E.D., and Siebert, P.D. (1996), *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93, 6025-6030.

10 Fields S, Song O (1989) A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature* 20; 340(6230):245-6

Gaudi C, Kremer F, Angevin E, Scott V, Triebel F (1999), *J Immunol* 162:1730-1738

15 Gerstein, M. and Jansen, R. (2000). The current excitement in bioinformatics-analysis of whole-genome expression data: how does it relate to protein structure and function. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 10:574-584.

Graziano, R.F., et al., (1995), *J. Immunol.* 155: 4996-5002

20 Griffiths, A.D., et al., (1994), *EMBO J.* 13: 3245-3260

Grosveld, F. and Kollia, G. *Transgenic Animals*, Academic Press (1992)

Hamburger, A.W. and Salmon, S.E. (1977). Primary bioassay of human tumor stem cells. *Science*. 197 25 (4302):461-463.

Hesketh, R., (1995), *The oncogene*, Academic Press

Higgins, D. G., Thompson, J. D. and Gibson, T. J. Using CLUSTAL for Multiple Sequence Alignments. *Methods Enzymol.* 266, 383-402 (1996).

5 Hogan KT, Eisinger DP, Cupp SBC, Lekstrom KJ, Deacon DD, Shabanowitz J, Hunt DF, Engelhard VH, Slingluff CL, Ross MM (1998), *Cancer Res* 58:5144-5150

Hofmann, K., Buchner, P., Falquet, L. and Bairoch, A. The PROSITE database, its status in 1999. *Nucleic Acids Res.* 27, 215-219 (1999).

10 Hubank, M. and Schatz, D.G., (1994), *Nucleic. Acids. Res.* 22, 5640-5648.

Jakobovits, A., (1995), *Curr. Opin. Biotechnol.* 6: 561-566

Kasten, M.B., (1997), *Genetic Instability and*  
15 *Tumorigenesis*, Springer Verlag

Knight, S. J., Horsley, S. W., Regan, R., Lawrie, N. M., Maher, E. J., Cardy, D. L., Flint, J., and Kearney, L. (1997). Development and clinical application of an innovative fluorescence *in situ* hybridization technique which detects submicroscopic rearrangements involving telomeres. *Eur. J. Hum. Genet.* 5:1-8.

20 Köhler, G. und Milstein, C. (1975), *Nature* 265, 495-497

Kozak, M (1987), An analysis of 5`noncoding sequences  
25 from 99 vertebrates messenger RNA's . *Nuc.Ac.Res.* Vol.15: 8125-8147

Kruif, J., et al., (1995), Proc. Natl. Acad. Sci.  
USA 92: 3938-3942

Kyte, J and Doolittle, RF (1982), J. Mol. Biol. 157:  
105-132

5 Liaw, L., Skinner, M.P., Raines, E.W., Ross, R.,  
Cheresh, D.A., Schwartz, S.M., and Giachelli, C.M..  
(1995). The adhesive and migratory effects of  
osteopontin are mediated via distinct cell surface  
integrins. Role of alpha v beta 3 in smooth muscle  
10 cell migration to osteopontin in vitro.  
*J.Clin.Invest.* 95 (2):713-724.

Lichter, P., Cremer, T., Borden, J., Manuelidis, L.,  
and Ward, D. C. (1988). Delineation of individual  
human chromosomes in metaphase and interphase cells  
15 by in situ suppression hybridization using  
recombinant DNA libraries. *Hum. Genet.* 80:224-  
234. Mandruzzato S, Brasseur F, Andry G, Boon T, van  
der Bruggen P (1997) , *J Exp Med* 186:785-793

McGuinnes, B.T., et al., (1996), *Nature Biotechnol.* 14,  
20 1149

Neuberger, M.S., et al., (1984), *Nature* 312: 604-608

Pearson, W. R. and Lipman, D. J. Improved tools for  
biological sequence comparison. *Proc. Natl. Acad.*  
*Sci. USA* 85, 2444-2448 (1988).

25 Pusztal et al., 1996, cell proliferation in cancer,  
Oxford medical publications

Rauscher, F.J. et al., (1997), Chromosomal translocations and oncogenic transcription factors, Springer Verlag

Riechmann, L., et al., (1988), Nature 332: 323-327

5 Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T. (1989). "Molecular Cloning: A laboratory Manual" 2<sup>nd</sup> ed., Cold Spring Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.

10 Schultz, J., Copley, R. R., Doerks, T., Ponting, C. P. and Bork, P. SMART: A Web-based tool for the study of genetically mobile domains. Nucleic Acids Res. 28, 231-234 (2000).

15 Toes, R.E., Hoeben, R.C., Van der Voort, E., Ressing, M.E., Van-der-Eb, A.J. Melief, C.J.M., and Offringa, R. (1997), Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 94 (26): 14660-14665

Velculescu, VE, Zhang, L, Vogelstein, B, and Kinzler, KW (1995), Science 270: 484-487

Winter, G., et al., (1994), Annu. Rev. Immunol. 12, 433-455

20 Woelfel, T, Schneider, J, Zum Buschenfelde, Meyer, KH, Rammensee, HG, Rotzschke, O, and Falk, K (1994), Int. J. Cancer 57: 413-418

25 Wu, T.C., Guarnieri, F.G., Staveley-O'Carroll, K.F., Viscidi, R.P., Levitsky, H.I., Hedrick, L., Cho, K.R., August, J.T., and Pardoll, D.M. (1995), Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 92(25): 11671-11675.

## Patentansprüche

1. Tumorassoziiertes Antigen der Bezeichnung B345, dadurch gekennzeichnet, dass es die in SEQ ID NO:4 definierte Aminosäuresequenz aufweist oder diese als Teilsequenz enthält, oder ein Fragment davon.
- 5 2. Isoliertes DNA-Molekül, kodierend für das in Anspruch 1 definierte tumorassoziierte Antigen oder für Fragmente davon.
- 10 3. DNA-Molekül nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, dass es ein Polynukleotid mit der in SEQ ID NO:3 dargestellten Sequenz ist oder diese Sequenz enthält oder dass es ein Polynukleotid ist oder dieses enthält, das mit einem Polynukleotid der in SEQ ID NO:3 dargestellten Sequenz unter stringenten Bedingungen hybridisiert, oder ein Fragment davon.
- 15 4. Rekombinantes DNA-Molekül, enthaltend ein DNA-Molekül gemäß Anspruch 2 oder 3.
- 20 5. Pharmazeutische Zusammensetzung für die Immuntherapie von Krebs, enthaltend als wirksame Komponente das in Anspruch 1 definierte tumorassoziierte Antigen der Bezeichnung B345 oder ein oder mehrere Fragmente davon.
- 25 6. Pharmazeutische Zusammensetzung für die Immuntherapie von Krebs, enthaltend als wirksame Komponente ein DNA-Molekül gemäß einem der Ansprüche 2 bis 4.

7. Antikörper gegen das in in Anspruch 1 definierte Polypeptid.
8. Antikörper nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, dass er monoklonal ist.
- 5 9. Antikörper nach Anspruch 7 oder 8 für die Therapie und Diagnose von Krebserkrankungen, die mit der Expression von B345 assoziiert sind.

**Zusammenfassung**

5

Tumorassoziiertes Antigen B345 und dafür kodierende  
DNA-Moleküle.

10